

10/500334
PCT/JP02/13857

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

27.12.02

REC'D 03 MAR 2003
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年12月28日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-400258

[ST.10/C]:

[JP2001-400258]

出 願 人

Applicant(s):

サントリー株式会社

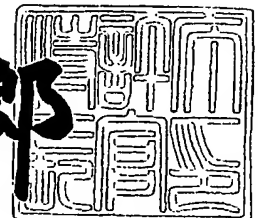
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3006003

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 013012

【提出日】 平成13年12月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07H

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内

 【氏名】 前田 満

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎5丁目2番5号 サントリー株式会社基礎研究所内

 【氏名】 中尾 正宏

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎5丁目2番5号 サントリー株式会社基礎研究所内

 【氏名】 深見 治一

【特許出願人】

 【識別番号】 000001904

 【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089705

 【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 社本 一夫

 【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

 【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠武

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【選任した代理人】

【識別番号】 100092886

【弁理士】

【氏名又は名称】 村上 清

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706781

【プルーフの要否】 要

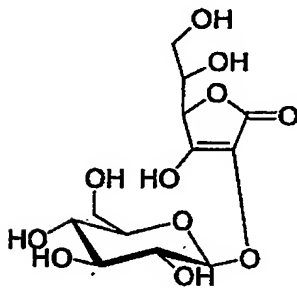
【書類名】 明細書

【発明の名称】 2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、その製造法、およびそれを含有する組成物を含む食品ならびに化粧品

【特許請求の範囲】

【請求項1】 つぎの式(1)で示される2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸またはその人体に安全な塩もしくはエステル。

【化1】



【請求項2】 植物体から抽出される2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有するプロビタミンC組成物。

【請求項3】 植物体が、ナス科の植物である請求項2に記載の組成物。

【請求項4】 植物体がクコ、クコの生果あるいは乾燥果実である請求項3に記載の組成物。

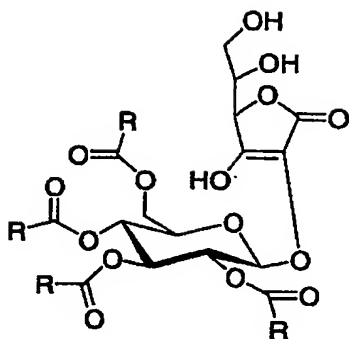
【請求項5】 植物体から抽出することによる2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の製造法。

【請求項6】 植物体が、ナス科の植物である請求項5に記載の製造法。

【請求項7】 植物体がクコ、クコの生果或いは乾燥果実である請求項5または6に記載の製造法。

【請求項8】 つぎの式(2)で示される2-0-(テトラ-O-アシル- β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸：

【化 2】



(式中、各 R はそれぞれ独立して、炭素数 1 ～ 5 のアルキル基である。)

【請求項 9】 式 (2) において、R がすべてアセチル基である、請求項 8 に記載の化合物。

【請求項 10】 2-O-(テトラ-O-アシル-β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸誘導体を中間体として用いる 2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の製造法。

【請求項 11】 アスコルビン酸と β-D-グルコシル糖化合物を、β-グルコシル糖転移酵素を用いて反応させることによる 2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の製造法。

【請求項 12】 2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸が、6-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸とともに生成することを特徴とする請求項 11 記載の製造法。

【請求項 13】 β-D-グルコシル糖転移酵素がセルラーゼであることを特徴とする請求項 11 記載の 2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の製造法。

【請求項 14】 請求項 10 ～ 13 で示される製造法により生成される 2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有するプロビタミン C 組成物。

【請求項 15】 請求項 10 ～ 13 で示される製造法により生成される 2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を 6-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸とともに含有するプロビタミン C 組成物。

【請求項 16】 請求項 1、2、3、4、14 および 15 で示される 2-O-(

β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、またはそれを含有する組成物をプロビタミンCとして含む食品。

【請求項17】 ビタミンC強化食品である請求項16の食品。

【請求項18】 請求項1、2、3、4、14および15で示される2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、またはそれを含有する組成物がプロビタミンCとして配合された紫外線障害保護剤。

【請求項19】 請求項1、2、3、4、14および15で示される2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、またはそれを含有する組成物がプロビタミンCとして配合された美白化粧品。

【請求項20】 請求項1、2、3、4、14および15で示される2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、またはそれを含有する組成物がプロビタミンCとして配合された、しわ・たるみを予防する化粧品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プロビタミンCとして知られていた物質、例えば2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸に比べ、安定性が増大するとともに生体内での半減期が増大し、持続的に作用する効果を有する新規なプロビタミンCである2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸に関する。さらにその新規中間体である2-O-(テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、また、2-O-(テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸誘導体を中間体とする2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の製造法、植物体から抽出する2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の製造法、特にクコあるいはクコ類縁種から抽出する2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の製造法と、得られた2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物、および酵素法による2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸ならびに6-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸と2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物の製造方法、ならびにそれら組成物の食品や化粧品としての用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ビタミンCはその不足が壊血病の主原因となるコラーゲンの合成を促進したり、生体内抗酸化物質として生体内で生成するフリーラジカルを消去したり、チトクロームCの鉄イオンの酸化還元反応に関与するなどの生理作用以外に、抗がん、免疫賦活、コレステロール生成抑制に伴う抗動脈硬化などの多くの作用が知られている。また、皮膚領域においても、抗酸化やコラーゲン合成促進などに基づく光老化防止、紫外線障害の予防、色素沈着の抑制などの作用を有し、化粧品に添加されている（フレグランスジャーナル、25巻、3月号、特集、1997年）。また、酸化防止剤としても、食品や化粧品に添加されている。ビタミンCは光、熱、酸素、金属イオンなどに対して非常に不安定であり、これが最大の問題点になっている。

【0003】

ビタミンCの不安定性を改善するために、また物性を変えることによって体内貯留や吸収性を向上するために種々の変換がなされてきた（日本臨床 57巻、10号、170ページ、1999年）。

【0004】

プロビタミンCと呼ばれる安定なビタミンCへの展開として、ビタミンCの抗酸化モイエティーであり、かつ不安定性の原因となっている2,3-エンジオールの水酸基への置換基の導入がなされた。例えば、2位水酸基への硫酸基（*Biochemistry*, 8, 2652, 1969）やリン酸基（*Gazz. Chim. Ital.*, 91, 964, 1961および *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 381, 1969）の導入である。これらはビタミンCに比べて、安定性ははるかに向上しており、サルファターゼやフォスファターゼにより、生体内や細胞内で加水分解され、ビタミンCに変換されることが知られている。これらの誘導体は化粧品や医薬部外品としてすでに使用されている。また、2位や3位の水酸基が配糖体化された安定型ビタミンCも知られている。糖転移酵素によって得られた2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸（*Biochim. Biophys. Acta*, 1035, 44, 1990、特開平3-135992、3-139288、3-183492、5-117290）、ガラクトシダーゼによって得られた2-O-

(β -D-ガラクトピラノシル) アスコルビン酸 (特開平 6-263790)、また化学合成によって得られた 3-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸 (特開昭 53-98954、特開昭 58-198498) などである。

【0005】

これらの中で、2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸が最もよく研究され、現在、化粧品や医薬部外品として使用されており、食品添加物として認可されようとしている。2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸はアスコルビン酸-2-リン酸と同様に種々の酸化条件に対し極めて安定であり、酸性条件下でははるかに安定である。2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は経口投与で消化管粘膜に存在する α -グルコシダーゼによって加水分解され、活性型のビタミンCとなる。培養細胞においても細胞膜に存在する酵素によって適度に加水分解され、ビタミンCの作用が持続的に発揮される。

【0006】

また、酸化に対する不安定性の改善にはならないが、アスコルビン酸の6位を脂肪酸エステルにして、脂溶性物質にも溶解しやすい6-O-パルミトイルあるいはステアロイルアスコルビン酸が食品中の酸化防止剤としての食品添加物に使用されている。6位の配糖体も酵素で合成されている (Vitamins, 43, 205, 1971; Biochim. Biophys. Acta, 1035, 44, 1990; 特開平 5-320185)。5位の配糖体も2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の酵素合成の副生成物として開示されている (特開平 5-112594)。

【0007】

このように既にプロビタミンCとして多様な物質が知られているが、 β -D-グルコシル体、特に2位がグルコシル化された物質、とりわけ、本発明の新規化合物である2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸については全く知られておらず、例えば、特開平 3-13599 などにおいて、 β -D-グルコピラノシル型のL-アスコルビン酸誘導体は生体内で分解されないと開示しているなど、 β グルコシル配糖体は生体において利用できないとしてその有用性を否定する文献が存在した。

【0008】

また、種々のアスコルビン酸誘導体とともに、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸が特開昭53-98954に記載されているが、具体的に製造した実施例はなく、また、実際に実施例の方法で合成しても3位の水酸基に優先的にグルコシル化され、3位にグルコシル化された生成物に対して2位にグルコシル化される形で、2, 3-ジグルコシル体が生成すると考えられる。したがって、2位だけに β -グルコシル化された生成物を得ることは不可能であった。

【0009】

さらに、 β -D-グルコピラノシル型のL-アスコルビン酸誘導体の酵素合成に関しては、アーモンド由来 β -グルコシダーゼがセロビオースを β -グルコシル糖供与体として6-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を生成する事が報告されているのみである (Agric. Biol. Chem., 54, 1697, 1990)。この場合でも、6-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の転移収率は1.5%と非常に低いものであり、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸が生成する記載はない。以上のように2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸に関しては、酵素法により合成された例は全く知られていなかった。

【0010】

一方、クコはナス科の植物で、古代中国の医学書「神農本草経」の上品として収載され、その果実は枸杞子(クコシ)、葉は枸杞葉(クコヨウ)と称して食品に、根皮は地骨皮(ジコ皮皮)と称して漢方処方に用いられている(原色和漢薬図鑑(上)、289、1980)。クコはベタイン、カロチン、ニコチン酸、ゼアキサンチンなどを含み、血糖降下作用、血圧低下作用、抗脂肪肝作用、肝機能保護作用を有することが知られている。特に、抗脂肪肝作用や肝機能保護作用は、メチル基供与体の作用があるベタインによるものとされている(日薬理誌、56、1518、1960)。また、枸杞の抽出物には乳酸菌の生長と酸の生産を促進する働きがあることが知られていた(C.A. 64:20530b, 1965)。しかしクコの成分中、ビタミンC誘導体が含まれているとの知見は存在しなかった。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは多様な作用を有するクコに注目し、その活性成分について鋭意研

究の結果、新規物質が含まれていることを見出し、それが2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸であることを突き止めて本発明の一部を完成させた。本発明は、まず新規物質2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、およびクコから抽出する2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸含有組成物とその製造方法を提供するものである。

【0012】

本発明の新規物質はプロビタミンCとして有用である。小腸組織では膜結合型、肝臓や腎臓組織では細胞質型の β -グルコシダーゼが存在していることが知られており (FEBS Letters, 436, 71, 1998)、また、 α -グルコシダーゼが唾液や腸消化液、さらに小腸消化管中に多く分布するために、経口吸収時にアスコルビン酸に分解されることが推測され、山本らの報告 (J. Pharmacobio-Dyn. 13, 688, 1990) においても、ラット経口投与実験で血中にはアスコルビン酸のみ検出されていることから、生体において分布率の高い α -グルコシダーゼで活性化されるより、分布率が少ない β -グルコシダーゼで分解されて活性化される方が組織への移行や作用の持続性に関して有利であるという説があり、 β グルコシル配糖体のプロビタミンCにはさらに優れた性質を有する可能性が期待されていた。

【0013】

そこで本発明の新規化合物2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の活性を研究の結果、2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸と比較して安定性が向上し、また生体内で持続的に利用されるなど、プロビタミンCとして極めて有用であることを見出した。さらに、食品や化粧品等に利用するために工業的な製造方法を検討し、化学的製造法、天然の植物体からの抽出による製造法、酵素的製造方法を確立させて本発明を完成させた。

【0014】

即ち、本発明は、化粧品や医薬部外品、医薬品あるいは食品の分野で応用が期待でき、2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸よりその生理作用が優れた新規物質2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、またその新規中間体である2-0-(テトラ-0-アセチル- β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、その中間体を經由する2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の化学合成によ

る製造方法、植物体、とりわけ、クコ或いはクコ類縁物から抽出する2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含む組成物の製造方法、および、 β -D-グルコシル糖転移酵素による2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含む組成物の製造方法、ならびに得られた2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物と、それら組成物を含有する食品や化粧品を提供するものである。

【0015】

また、本発明は糖転移酵素反応により得られた2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸あるいは6-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物を提供するものである。併せて、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する溶液からその夾雑物を容易に除去し、より高純度の2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸高含有物を工業的に大量生産する方法を提供するものである。

【0016】

本明細書において、「組成物」とは2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含む植物体から抽出された、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の含有量を高めた抽出物、またはアスコルビン酸と β -D-グルコシル糖化合物を β -グルコシル糖転移酵素を用いて反応させて得られる、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する反応産物を含めて、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する種々の組成物を意味する。

【0017】

本明細書において、「プロビタミンC」とは、それ自体はビタミンC活性が弱いまたは示さないが、体内で分解されてビタミンCを生じる化合物または該化合物を含む組成物の総称である。

【0018】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、クコから発見された新規物質2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸による理想的なプロビタミンCの創製を目指して、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の合成方法を鋭意検討し、2-0-(テトラ-0-アセチ

ル-β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を中間体として、化学的に製造できること、また、2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する植物、微生物を鋭意検索し、クコおよびクコシに2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸が存在すること、セルラーゼ酵素の糖転移反応により2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸が生成すること、そして2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸が2-O-(α-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸に比較してヒト皮膚表皮由来角化細胞への紫外線B波の照射による細胞死を顕著に抑制し、またヒト皮膚真皮由来の線維芽細胞におけるコラーゲン合成を顕著に促進することを示し、実際に2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸が優れたプロビタミンCであることを見出し、本発明を完成するに至った。本発明は以下のようである。

【 0 0 1 9 】

プロビタミンCとしての性能が2-O-(α-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸より優れた2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を製造するには、2-O-(テトラ-O-アシル-β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を中間体とする合成方法、2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する天然材料からの抽出方法、または酵素による合成方法により製造することができる。

【 0 0 2 0 】

合成方法においては、相当するアスコルビン酸誘導体の3位の水酸基を選択的にベンジル化して、3-O-ベンジル-5,6-O-イソプロピリデンアスコルビン酸を得、これとエステルで保護されたグルコースの1-炭酸エステルとを縮合し、その後、脱イソプロピリデン化、脱ベンジル化して得ることができる。天然材料からの抽出方法においては、ナス科の植物体、特にクコの実あるいは乾燥果実(クコシ)から、熱水または水-アルコール抽出することによって、2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物を得ることができる。また、必要なら、この組成物から2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸をさらに精製することができる。酵素合成法においては、セルラーゼ酵素の糖転移反応により2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を酵素的に合成して、2-O-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物を酵素合成産物として得る

ことができる。必要なら、この組成物から2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸をさらに精製することができる。

【0021】

2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸がヒト皮膚表皮由来角化細胞への紫外線B波の照射による細胞死を顕著に抑制し、かつヒト皮膚真皮由来の線維芽細胞におけるコラーゲン合成を顕著に促進すること、また細胞内でビタミンCに変換されること、さらにまた経口摂取によって吸収されることが本発明において示されたことにより、皮膚化粧品や皮膚保護剤としての利用、またプロビタミンCとして食品での利用が期待できる。

【0022】

【発明の実施の形態】

本発明は、化粧品や医薬部外品、あるいは医薬品あるいは食品の分野で応用が期待でき、2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸よりその生理作用が優れた2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸またその中間体である2-0-(テトラ-0-アセチル- β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸およびそれを中間体とした2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の製造方法、および2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有するクコあるいはクコ類縁種およびそれらの抽出物および2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物を提供するものである。

【0023】

また、糖転移酵素反応により得られた2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸あるいは6-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物を提供するものである。併せて、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する溶液からその夾雑物を容易に除去し、より高純度の2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸高含有物を工業的に大量生産する方法を提供するものである。

【0024】

以下、発明の内容について詳細に説明する。

1) 中間体2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アシル- β -D-グルコピラノシル)アスコル

ビン酸の合成

中間体である2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アシル- β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は以下のようにして合成することができる。すなわち、市販されている5,6-0-イソプロピリデンアスコルビン酸を文献既知 (J. Med. Chem., 31, 793, 1988) の方法で3位の水酸基を選択的にベンジルエーテル化し、3-0-ベンジル-5,6-0-イソプロピリデンアスコルビン酸とする。この3-0-ベンジル体をアグリコンとして、通常のグルコシル化反応によって β -配糖体化し、2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アシル- β -D-グルコピラノシル)-3-0-ベンジル-5,6-0-イソプロピリデンアスコルビン酸を得ることができる。例えば、(2,3,4,6-テトラ-0-アセチル- β -D-グルコピラノシル)炭酸エステル (小村啓、東京工業大学博士論文、1977年) を3-0-ベンジル体とともに非極性溶媒中で、あるいは無溶媒で100～200℃で加熱することによって得ることができる。炭酸エステルとしてはアルキル、ハロゲン化されたアルキル、あるいは置換されてもよいアリール炭酸エステルとして使用することができる。あるいは(2,3,4,6-テトラ-0-アセチル- β -D-グルコピラノシル)ハライドを用いて、クロロホルムや塩化メチレンなどのハロゲン化炭化水素の溶媒やベンゼン、トルエンなどの芳香族炭化水素の溶媒中で水銀塩や銀塩の存在下、脱水剤を添加して反応させることによって得ることもできる (Lodd's Chemistry of Carbon Compounds IF, 320, 1967, Elsevier)。

【0025】

2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アシル- β -D-グルコピラノシル)-3-0-ベンジル-5,6-0-イソプロピリデンアスコルビン酸のイソプロピリデン基は酸触媒で加水分解して、除去することができる。例えば、30%～80%の酢酸水溶液中、40～100℃で加熱する。あるいはアセトンやメチルエチルケトン中でp-トルエンスルホン酸の存在下、室温から還流温度で加熱する。あるいはそこに水を添加して同様に反応させる。

【0026】

2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アシル- β -D-グルコピラノシル)-3-0-ベンジルアスコルビン酸のベンジル基は通常の水素化分解によって除去できる。例えば、酢酸やアルコールなどのプロトン性極性溶媒中で、あるいはベンゼン、トルエン、酢酸

エチルなどの非極性溶媒中で、パラジウム炭素やパラジウム黒、あるいはプラチナ炭素やプラチナ黒などを触媒として水素の存在で脱ベンジル化できる。

【 0 0 2 7 】

これらの脱保護基反応の工程を逆の順に行ってもよい。すなわち、2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アシル-β-D-グルコピラノシル)-3-0-ベンジル-5,6-0-イソプロピリデンアスコルビン酸の脱ベンジル化反応の後、得られた2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アセチル-β-D-グルコピラノシル)-5,6-0-イソプロピリデンアスコルビン酸を酸触媒で脱イソプロピリデン化してもよい。

【 0 0 2 8 】

以上のようにして、表記中間体である2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アシル-β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を得ることができる。

表記中間体のアシル基として、アセチル基が好ましい。

【 0 0 2 9 】

2) 2-0-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の化学合成

2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アシル-β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸のアシル基をアルカリ加水分解することによって、2-0-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を得ることができる。アルカリとしては、苛性ソーダ、苛性カリなどの水溶液、あるいは炭酸カリ、炭酸ソーダ、重炭酸カリ、重炭酸ソーダなどの炭酸塩の水溶液、ナトリウムメチラートなどの金属アルコラートを用いることができる。これらの溶液に、原料の2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アシル-β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を溶解するために、メタノール、エタノールなどのアルコール類の混合液を用いてもよい。反応温度は0℃～室温が最適である。反応液を塩酸、硫酸あるいはカチオン交換樹脂などで中和する。塩酸や硫酸の場合は生じた塩を除去する必要があるがカチオン交換樹脂の場合はナトリウムやカリウム根を吸着するために脱塩操作は必要ではない。中和された反応液を凍結乾燥あるいは減圧濃縮することによって、目的化合物を得ることができる。また、目的に応じて、カラムクロマトグラムによって精製することもできる。

【 0 0 3 0 】

3) クコからの抽出による2-0-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含

有する組成物の製造

クコの生果あるいは乾燥果実（クコシ）を直接もしくは粉碎した状態で、水性溶媒、例えば熱水または含水エタノールで浸漬し、固液分離によって得た抽出液を減圧濃縮もしくは凍結乾燥、あるいは噴霧乾燥することによって、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する抽出物を得ることができる。この浸漬時のアルコール濃度は10%から95%、浸漬日数は3から7日が好ましい。

【0031】

クコシ抽出物中の2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸含量は、典型的には0.86から1.2%であるが、以下に述べる方法によってさらに含量を高めた組成物を得ることができる。すなわち、クコシ抽出物を蒸留水に溶かすか、原料に対して5-50倍量、好ましくは8-10倍量で浸漬した上記抽出液を蒸留水で希釈後、Dowex 1-X8 (Dow Chemical Co.)、Amberlite IRA-400 (Rohm & Haas Co.) などの強塩基性陰イオン交換樹脂に通導して、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を吸着させる。充分な水洗浄の後、酢酸等の酸溶液を用いた段階溶出もしくは濃度勾配溶出によって該物質を含む画分を得る。該画分を減圧濃縮あるいは凍結乾燥処理による酢酸除去によって、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸含量約30-50%の組成物が得られる。

【0032】

4) 酵素法による2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含む組成物の製造

市販の酵素剤について鋭意検討した結果、セルラーゼ「オノズカ」、パンセラゼBR（ヤクルト薬品工業）、セルロシン（阪急共栄物産）、セルラーゼ（シグマ）、 β グルコシダーゼ（東洋紡）、 β グルコシダーゼ（ナカライテスク）酵素剤が β グルコシル転移活性を有する事を見出した。本発明に用いられる糖転移酵素は、 β グルコシル基を含む化合物とアスコルビン酸を含む溶液に作用させ、糖転移反応によって2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を合成するものであればよく、起源、種類は限定されないが、収率の点からTrichoderma属由来のセルラーゼ剤、アーモンド由来の β グルコシダーゼ剤が好ましい。

【0033】

転移酵素反応については、セロビオースおよびアスコルビン酸濃度はできる限り高い方が望ましいが、それぞれ0.3Mおよび0.2M程度が好ましい。酵素の基質となるセロビオースは他の β グルコシル基を含む化合物、例えばセルロース、カルボキシメチルセルロース等の高分子グルカンからも適当な加水分解酵素と組み合わせる事により使用する事が可能である。また各酵素を常法で適当な支持体に固定化して酵素リアクターとすれば効率的に2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の生産が可能である。一方、転移反応の受容体となるアスコルビン酸は、反応中の安定性、転移収率の点から遊離のアスコルビン酸が好ましいが、アスコルビン酸のアルカリ金属塩若しくはアルカリ土類金属塩などのアスコルビン酸塩、または、それらの混合物でも生産が可能である。またイソアスコルビン酸フリー体およびイソアスコルビン酸塩も同様に転移反応の受容体となる事を見出した。従って、糖転移反応に用いるアスコルビン酸およびアスコルビン酸誘導体は目的に応じて用いる事ができるが、通常、遊離のアスコルビン酸だけでなく、必要に応じて、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸カルシウムなどが適宜用いられる。

【0034】

酵素反応はpH2～8の範囲の水性溶液中で進行するが、酵素の至適pHを勘案し、pH4～6に保つのが好ましい。また反応温度としては20～60℃で進行するが、酵素の安定性および至適温度をを勘案して、30～40℃程度に保つ事が望ましい。また酵素添加量は、セロビオース1gあたり20～400単位（1単位とは1分間に1 μ molのp-ニトロフェノールを遊離する酵素力価を示す）とするのが望ましい。酵素は、一度に添加しても良いが、高速液体クロマトグラフィー等で反応をモニターしながら、数回に分けて添加することも出来る。また適当な樹脂担体、例えばイオン交換樹脂、疎水樹脂等に酵素を固定化して酵素リアクターとして反応することもできる。反応時間は1～4日間程度で充分であるが、反応をモニターしながら反応終了時点を決定することもできる。

【0035】

反応終了後生成した組成物中のアスコルビン酸誘導体を、所望によりさらに精

製するには、膜分離、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー等、通常の分離手段で分離することができる。例えば、強酸性カチオン交換樹脂はスルホン酸基を結合したスチレンージビニルベンゼン架橋共重合体樹脂のアルカリ金属塩型、アルカリ土類金属塩型、または H^+ 型などが適宜使用できる。市販品としては、ダウケミカル社製造の商品名ダウエックス 50W×8、ローム&ハース社製造の商品名アンバーライトCG-120、三菱化成工業社製造の商品名ダイヤイオン SK104 などがある。この際に、分離される未反応のアスコルビン酸と β グルコシル基を含む化合物を、再度酵素反応の原料として利用することも可能である。

【0036】

さらに、高純度品を得るために、高速液体クロマトグラフィーによって精製することができる。すなわち、糖・有機酸分析用カラムと酢酸、トリフルオロ酢酸など揮発性の酸との組み合わせ、あるいはODSカラムと昇華性のギ酸アンモニウム、酸性物質分析用の揮発性イオンペア試薬、Di-n-butylamine Acetateとの組み合わせによって純粋な該物質を得ることができる。目的とする物質であることの同定は、化学的な合成による2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の質量分析や核磁気共鳴スペクトルとの比較解析によって行うことができる。

【0037】

2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は、食品、化粧品、または医薬に適する塩の形で用いることも可能である。塩の例として、無機もしくは有機のアルカリとの塩、例えばナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アミン塩等が挙げられる。2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は、その水酸基が、生体内で容易に分解される脱離基で置換されていてもよい。そのような脱離基として、アセチル(C2)、プロピオニル(C3)、ブチリル(C4)、オクタノイル(C8)、パルミトイル(C16)、ステアロイル(C18)が挙げられる。

【0038】

5) 2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の活性 (その1) : 紫外線照射による障害の抑制

2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は紫外線B波 (UVB) 照射によるヒト皮膚表皮由来の角化細胞 (HaCaT) の細胞死をアスコルビン酸や2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸に比較して、同じ濃度で明らかに強く抑制する。

【0039】

無毛マウスの皮膚の一部に太陽光の波長スペクトルに近い光 (290~400nm) を照射した場合に、マウス皮膚に含まれる各種の抗酸化因子のうちアスコルビン酸 (ビタミンC) が最も急減することが知られている (Photodermatol Photoimmunol Photomed., 10(5), 183, 1994)。また、モルモット背部を剃毛後、UVB照射による皮膚炎症の惹起をアスコルビン酸や2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の外用塗布によって抑制することができ、その効果は2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の方が高い (フレグランスジャーナル、25巻、3月号、55ページ、1997年)。さらに、10%アスコルビン酸水溶液をブタ皮膚に3日から1週間連日投与することにより、紫外線障害を軽減できることも報告されている (Br. J. Dermatol., 121, 247, 1992)。

【0040】

これに対して、本発明の2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は、紫外線照射による皮膚炎症やその他の紫外線障害の抑制に対して、アスコルビン酸はもちろん2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸よりもさらに効果が高い。その理由は、先に述べたとおり2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸よりも組織への移行や持続性に優れるためであろうと考えられる。

【0041】

また、ヒト皮膚角化細胞での細胞内アスコルビン酸の濃度についても、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は最も長く、また高濃度に維持される。このような2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸による細胞内アスコルビン酸の高濃度維持がUVB照射による細胞保護に作用していると考えられる。また、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸が細胞内で、アスコルビン

酸に変換されるプロビタミンCとして働いていることは明白である。

【0042】

2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の活性(その2)：しわ・たるみの予防

さらに、ヒト皮膚真皮由来の線維芽細胞(NHDF)のコラーゲン合成に関しても、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸やアスコルビン酸に比べて活性が高い。これも、細胞内アスコルビン酸の濃度が持続的に高く維持されているためと考えられる。すなわち、アスコルビン酸のコラーゲン合成促進作用は皮膚由来の線維芽細胞でも起こっており、皮膚の再生や再構築に働いていると考えられる。実際に、熱傷患者に安定型アスコルビン酸の1つであるアスコルビン酸2-リン酸を塗布することによって、瘢痕なく治癒したことが報告されている(日本化粧品学会講演要旨 50ページ、1998年)。一方、アスコルビン酸がコラーゲンを分解する酵素や皮膚の弾性に必要なエラスチンを分解する酵素を抑制することも知られている(バイオ酸化剤プロビタミンC, 63ページ、1999年、フレグランスジャーナル社)。これらの事実は2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸にしわやたるみを予防する効果があることを示している。

【0043】

2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の活性(その3)：美白

また、アスコルビン酸がチロシナーゼを阻害してメラニン合成を抑制することや2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を配合したクリームをヒトに塗布した時、紫外線照射による色素沈着を抑制すること(フレグランスジャーナル、25巻、3月号、55ページ、1997年)から、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸も同様に、しかし2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸よりも強い美白効果があることが強く示唆される。

【0044】

2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の活性(その4)：経口摂取時の動態

また、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸をラットに経口摂取させ

た場合、血中に未変化体である2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸が検出され、腸管から未変化体として吸収されることを示している。一方、前述したように2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸はラットに経口摂取させた場合、血中には未変化体として検出されず、吸収の際、腸管でほとんど分解され、アスコルビン酸として血中に存在する(J. Pharmacobio-Dyn.,13,688,1990)。すなわち、経口摂取した場合、2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸はアスコルビン酸として吸収され、血中で速やかに分解される可能性がある。一方、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は血中に未変化体としても存在し、未変化体のまま組織に移行し、組織あるいは細胞内でアスコルビン酸に活性化される可能性が高い。

【 0 0 4 5 】

以上の実験結果および関連知見から、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸およびそれを含有する組成物は優れたプロビタミンCとして、皮膚の保護や健全な皮膚の維持に有用であることが明白であり、皮膚化粧料や皮膚保護剤として使うことができ、また食品として、アスコルビン酸を効率よく、体内および組織に移行させるプロビタミンCとして使うことができる。

【 0 0 4 6 】

6) 2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物

本発明の2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物を皮膚化粧料や皮膚保護剤として用いる場合、配合量として特に限定されず広範囲に使用することができるが、組成物の全重量に対して通常0.1～30重量%、好ましくは0.5～10重量%である。組成物として、一般に化粧料に用いられる油性成分、界面活性剤、紫外線吸収剤、低級アルコール、防腐剤、殺菌剤、色剤、粉末、香料、水溶性高分子、緩衝剤などその他の成分を本発明の効果を損なわない範囲で適宜配合することができる。これらの組成物は皮膚化粧料としてだけでなく、医薬部外品としてのローション、乳液、クリーム、パック剤、石鹸等の薬用化粧品、および医薬品としてのローション、乳液、クリーム、軟膏等の皮膚外用剤としても使用できる。

【 0 0 4 7 】

また、本発明の2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物を食品として用いる場合、例えば、2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸に関する特許第2832848号に記載されている通りの食品に応用することができ、ビタミンC強化食品として使用できる。すなわち、特許第2832848号から引用すると酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの呈味を有する各種物質ともよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、普通一般の飲食物、嗜好物、例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、焼肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの各種調味料、せんべい、あられ、おこし、カリントウ、求肥、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンデーなどの各種洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、バタークリーム、カスタードクリーム、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのスプレッド、ペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、パン類、麺類、米飯類、人造肉などの穀類加工食品類、サラダオイル、マーガリンなどの油脂食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、カマボコ、チクワ、ハンペンなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢コンブ、さきするめ、ふぐのみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、コンブ巻、天ぷらなどのそう菜食品、錦糸卵、乳飲料、バター、チーズなどの卵、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜などのビン詰、缶詰類、合成酒、増醸酒、果実酒、洋酒などの酒類、コーヒー、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席ジュース、即席コーヒー、即席しるこ、

即席スープなど即席飲食品などに、ビタミンC強化剤、呈味改善剤、酸味剤、品質改良剤、安定剤、抗酸化剤などの目的で有利に利用することができる。また、家畜、家禽、蜂蜜、蚕、魚などの飼育動物のための飼料、餌料などにビタミンC強化剤、呈味改善剤、抗酸化剤、嗜好性向上などの目的で配合して利用することも好都合である。

【0048】

【発明の効果】

本発明は、化粧品や医薬部外品あるいは医薬品あるいは食品の分野で応用が期待でき、2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸よりその生理作用が優れた新規物質2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、その新規中間体である2-0-(テトラ-0-アセチル- β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、およびそれを中間体とした2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の製造方法、並びにクコあるいはクコ類縁体から抽出精製する2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有組成物の製造法、およびクコあるいはクコ類縁種由来の2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物を提供するものである。

【0049】

また、糖転移酵素反応により得られた2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸あるいは6-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物を提供するものである。併せて、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する溶液からその夾雑物を容易に除去し、より高純度の2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸高含有物を工業的に大量生産する方法を提供するものである。

【0050】

【実施例】

以下、実施例に基づいて、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲をこれらの実施例に限定するものではないことは言うまでもない。

【0051】

実施例 1 2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アセチル- β -D-グルコピラノシル)アスコ

ルビン酸の合成：

5,6-0-イソプロピリデンアスコルビン酸 (2g、9.3mmol) をDMSO (20ml) に溶解し、炭酸カリ (1.3g、9.4mmol) および臭化ベンジル (1.1ml、9.3mmol) を加え、50℃で4時間攪拌した。反応液に水を加え、1N-HClで酸性にした後、酢酸エチルで抽出、水洗、飽和食塩水で洗浄後、無水MgSO₄で乾燥後、減圧濃縮し、シリカゲルクロマト (AcOEt/n-Hexane=3:1) で精製し、1.1gの3-0-ベンジル-5,6-0-イソプロピリデンアスコルビン酸を得た (収率：39%)。

【 0 0 5 2 】

このベンジル誘導体 (0.6g、2.0mmol) および2,3,4,6-テトラ-0-アセチル-1-0-(2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル)-β-D-グルコピラノース (2.1g、4.0mmol) の混合物を120-130℃で加熱溶融した。3時間反応後、反応液をカラムクロマト (25%AcOEt/n-Hexaneから50%までのグラジエント) で精製し、2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アセチル-β-D-グルコピラノシル)-3-0-ベンジル-5,6-0-イソプロピリデンアスコルビン酸850mgを得た (収率：67%)。

【 0 0 5 3 】

上記配糖体 (850mg、1.3mmol) を酢酸エチル (40ml) に溶解し、10%Pd-C (200mg) を加え、水素化分解した。2時間後、触媒をろ去し、濃縮して、約750mgの2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アセチル-β-D-グルコピラノシル)-5,6-0-イソプロピリデンアスコルビン酸を得た。

【 0 0 5 4 】

この脱ベンジル体 (500mg、0.9mmol) を酢酸 (5ml) に溶解し、水 (5ml) を加え、50-60℃で1.5時間加熱攪拌した。反応液を濃縮後、水洗、飽和食塩水で洗浄し、無水MgSO₄で乾燥後、減圧濃縮し、得られた残査を酢酸エチル-ヘキサンから結晶化し、320mgの2-0-(2,3,4,6-テトラ-0-アセチル-β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を得た (収率：48%)。 ¹H-NMR (δ ppm, DMSO-d₆) ; 1.94-2.01(12H), 3.42(3H, m), 3.7-4.3(4H, m), 4.7-5.1(4H, m), 5.3-5.4(2H, m), 12.00(1H, br)。 FABMS(+) m/z: 507。

【 0 0 5 5 】

実施例 2 2-0-(β-D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の合成：

2-O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸 (300mg、0.6mmol) をメタノール (10ml) に溶解し、炭酸カリ (600mg) を水 (9ml) に溶解した溶液を添加し、30分間攪拌した。反応液をIR-120(H^+)で中和し、樹脂をろ去し、さらにメタノールおよび50%メタノール水溶液で洗浄した。ろ液と洗浄液を合わせ、濃縮後、水を加え、凍結乾燥し、アモルファスな結晶 (190mg、収率：100%) の2-O- β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を得た。 1H -NMR (δ ppm, D_2O) : 3.1-3.3(4H, m), 3.4-3.5(3H, m), 3.58(1H d), 3.80(1H, t), 4.61(1H, d), 4.66(1H, d)。FABMS(-) m/z: 337。

【0056】

実施例 3 クコ中の2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の含量測定
2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の化学合成品の高速液体クロマトグラフィー (島津製作所 (株) 製 LC-10Ai システム、カラム: Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス (株) 製、4.6 X 150 mm、5 μ m)、移動相: 20% MeOH-20 mM リン酸-5 mM 臭化テトラ-n-アミルアンモニウム、流速: 1.0 mL/分、カラム温度: 35℃、検出波長: 254 nm) における保持時間 2.63 分を指標に、乾燥植物 3 g に対して10倍量の70% エタノールにて室温 7 日間浸漬することによって得た抽出液を 1.5% メタリン酸/5 M KOH (pH 3.5) にて10倍希釈し、これを被検試料として、天然に存在する2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を検索した。その結果、寧夏産および河北産クコシの抽出液中に、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸に相当するピークの存在を認めた。また、寧夏産クコの生果100 g に対して2倍量の70% エタノールを加え、同様に処理した試料にも同じように、その存在を認めた。一方抽出固形分は、上記抽出液の一部、5 mL を減圧濃縮後の凍結乾燥重量測定によって求めた。抽出固形分、化学合成品を用いた検量線、抽出液中の濃度、および希釈倍率を併せ考慮したところ、抽出物あたりの含量は 0.86 から 1.2 % であった。

【0057】

実施例 4 クコシに含まれる2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の精製

寧夏産クコシ 1 0 0 g を (株) トーヨー製錠剤粉碎器 T S - 1 0 M 型にて碎き、30% エタノール 8 0 0 m L を添加して、室温下 6 日間浸漬し、ろ過後、減圧濃縮、凍結乾燥により 6 5 . 7 g を得た。この抽出物の一部 1 . 9 4 g (2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸含量 0 . 8 6 %) を蒸留水にて溶解させ、4 0 m L とした (p H 4 . 5、電導度 1 . 7 m S / c m) 。この試料を Dowex 1-X8 カラム (酢酸型、1 . 5 X 1 2 c m) に S V = 1 にて通導した。通導後、約 10 カラム体積 (200 m L) の蒸留水による洗浄、0-0.1 M 酢酸の直線濃度勾配溶出 (100 m L X 2) 、そして 0.1-1.0 M 酢酸の直線濃度勾配溶出 (100 m L X 2) 、さらに 1.0 M 酢酸による溶出を行った。280 nm における吸光度を測定するとともに、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の溶出を化学合成品の保持時間を対照に、高速液体クロマトグラフィーによって調べた。装置、カラム温度は実施例 1 に同じだが、他の条件を、カラム: Inertsil ODS-3 (ジエールサイエンス (株) 製、3 . 0 X 1 5 0 m m、5 μ m)、流速: 0 . 3 m L / 分、検出波長: 245 nm、移動相: 2% MeOH-0.2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (p H 3.0) -0.2 mM EDTA-0.5 mM 塩化ドデシルトリメチルアンモニウムに変更したところ、化学合成品 2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の保持時間は 6 . 5 分であった。高速液体クロマトグラフィーによる検討の結果、カラムに吸着した該物質は 0.1-1.0 M 酢酸直線濃度勾配溶出の画分 19-25 に溶出した (26 m g、画分 19-25 の総回収率 7 8 %、純度 5 0 %) 。結果を図 1 に示す。

【 0 0 5 8 】

この 2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸に相当する画分 19-25 の一部を高速液体クロマトグラフィーに供することによって高純度品を得た。条件は、GILSON 社製 LC システム (マスターポンプ 3 0 5 型、UV 検出器 1 1 6 型)、カラム: ODS-UG-5 (野村化学 (株) 製、4.6 X 250 m m、5 μ m)、移動相: 5% メタノール-20 mM ギ酸アンモニウム-5 mM Di-n-butylamine Acetate、流速: 0 . 5 m L / 分、検出波長: 254 nm で、0.5 分ずつ、フラクションコレクター FC-2 0 3 B 型 (GILSON 社製) を用いて分取した。相当する画分を減圧濃縮、凍結乾燥後、重水に溶解さ

せ、核磁気共鳴スペクトルを測定することにより、合成品と比較した。結果を図2に示した。

【0059】

実施例5 2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の酵素合成

2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の化学合成品のGILSON社製 LCシステム (マスターポンプ305型、UV検出器116型)、カラム: Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス (株) 製、4.6 X 150 mm、5 μ m)、移動相: 20% MeOH-20 mM リン酸-5 mM 臭化テトラ-n-アミルアンモニウム、流速: 0.5 ml/分、検出波長: 254 nm) における保持時間5.2分を指標に、市販のセルラーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -グルカナーゼ酵素剤について検索した。なお、酵素反応系はセロビオース0.3Mおよびアスコルビン酸0.2Mとなるように10 mM酢酸緩衝液 (pH5.0) で溶解して1 mlとした。これに酵素液を50 μ l添加して37℃で反応を開始した。100℃、5分間加熱して反応停止した後、高速液体クロマトグラフィーで生成した β -D-グルコピラノシル-アスコルビン酸を分析した。その結果、セルラーゼ (シグマ社製)、 β -グルコシダーゼ (東洋紡、ナカライテスク)、セルロシンT2 (阪急共栄物産)、セルラーゼ「オノヅカ」RS、「オノヅカ」FAおよびパンセラーゼBR (ヤクルト薬品工業) に β グルコシル転移活性を有する事を見出した。遊離のアスコルビン酸が4.0分の位置に現れたのに対し、この前後の3.6分と5.2分の位置にピークが認められ、それぞれ物質X、物質Yとした。なお、物質Xの転移率は15.7%、物質Yの転移率は0.8%を示した。この物質Xと物質Yは化学合成品とのコクロマト分析より、物質Xは6-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、物質Yは2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸と保持時間が一致した。

【0060】

さらに、分子量1万カットのUF膜にて共存するタンパク質を除去した後、遊離のアスコルビン酸を除去するため、高速液体クロマトグラフィー[GILSON社製 LCシステム (マスターポンプ305型、UV検出器116型)、カラム: SUGAR SH1011 (昭和電工 (株) 製)、移動相: 0.1M 酢酸、流速: 0.

5 mL/分、カラム温度：30℃、検出：示差屈折計、0.25 mL/分画] を用いて分取した。物質Xと物質Yを含む画分は29-31に溶出され、収率96%で24.7 μ gの標品を得た。

【0061】

さらに、高速液体クロマトグラフィーに供することによって高純度品を得た。条件は、GILSON 社製 LCシステム（マスターポンプ305型、UV検出器116型）、カラム：ODS-UG-5（野村化学（株）製、4.6 X 250 mm、5 μ m）、移動相：5% メタノール-20 mM ギ酸アンモニウム-5 mM Di-n-butylamine Acetate、流速：0.5 mL/分、検出波長：254 nmで、0.5分ずつ、フラクションコレクターFC-203B型（GILSON社製）を用いて分取した。物質Xと物質Yに相当する画分を減圧濃縮、凍結乾燥後、重水に溶解させ、核磁気共鳴スペクトルを測定することにより、化学合成品2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸と比較した。HSQCスペクトルにおいて、化学合成品のアスコルビン酸部分構造中4位、5位、6位炭素の化学シフトはそれぞれ73、73、66 ppmであるのに対して、物質Xでは4位、5位、6位炭素の化学シフトはいずれも73 ppmと、6位に相当する炭素のみ低磁場シフトしていることから、物質Xは6-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸と考察された。

【0062】

物質Yは化学合成品2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸との一次元 ^1H -NMRスペクトル比較で一致したことから2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸であると結論づけた。結果を図3および図4に示した。

【0063】

実施例 6 転移酵素反応条件

1) 硫安分画

セルラーゼ剤（Sigma）4%となるよう20mM酢酸緩衝液（pH5.0）に溶解し、これに20%飽和毎の硫安を順次添加することにより、0-20%、20-40%、40-60%、60-80%飽和硫安沈殿画分を調製した。各画分は20mM酢酸緩衝液（pH5.0）に溶解した後、実施例5に準じて転移生成物の確認を行った。その結果、転移

活性は硫酸20-40%飽和画分に認められた。

【0064】

2) pHの影響

セロビオース0.3Mおよび遊離のアスコルビン酸0.2Mとなるように、各pHに調整した0.1M酢酸緩衝液で溶解して1mlとした。これに酵素液を50 μ l添加して37℃で40時間反応した。反応後、高速液体クロマトグラフィーで生成した(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を分析した。

【0065】

結果を表1に示した。pH3から転移生成物は認められるが、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸はpH5反応下で0.8%、pH6反応下で1.0%生成した。また、6-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸はpH5反応下で11.8%、pH6反応下で11.2%生成した。

【0066】

【表1】

pH	AA (%)	AA6 β G (%)	AA2 β G (%)
2	99.3	0.7	0
3	93.5	6.2	0.3
4	87.9	11.6	0.5
5	87.4	11.8	0.8
6	87.8	11.2	1.0

【0067】

3) アスコルビン誘導体での反応

セロビオース0.3Mおよび遊離のアスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸カルシウムおよび遊離のイソアスコルビン酸、イソアスコルビン酸ナトリウムを各々0.2Mとなるように、各pHに調整した0.1M酢酸緩衝液で溶解して1mlとした。これに酵素液を50 μ l添加して37℃で20時間反応した後、上記と同様に生成した(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を分析した。結果を表2に示した。各アスコルビン酸誘導体は転移反応の受容体となり得て、各々の2-O-(β -D-グルコピラノシル)誘導体が生成された。

【0068】

【表2】

	AA (%)	AA6 β G (%)	AA2 β G (%)
遊離アスコルビン酸	91.2	7.9	0.9
アスコルビン酸ナトリウム	97.6	1.6	0.8
アスコルビン酸カルシウム	95.9	2.8	1.3
遊離イソアスコルビン酸	95.4	3.8	0.8
イソアスコルビン酸ナトリウム	98.4	0.8	0.8

【0069】

4) 部分精製

セルラーゼ剤 (Sigma)、セルラーゼ「オノズカ」RSおよびパンセラーゼBR (ヤクルト薬品工業) について、酵素タンパク質を硫酸沈殿させた後、20mM酢酸緩衝液 (pH5.0) で平衡化したQ-セファロース (Amersham Pharmacia Biotech社製) イオン交換樹脂に供した結果、転移活性は全て素通り画分に認められた。結果を表3に示した。

【0070】

【表3】

酵素剤	AA (%)	AA6 β G (%)	AA2 β G (%)
セルラーゼ (シグマ)	89.9	9.0	1.1
オノズカ RS (ヤクルト)	86.4	11.6	2.0
パンセラーゼ BR (ヤクルト)	94.0	5.4	0.6

【0071】

5) 酵素の固定化

食品添加物として市販されている酵素製剤；パンセラーゼBR中には、酵素 (5%) 以外に乳糖95%が存在している。パンセラーゼBR酵素剤6gを20mM酢酸緩衝液 (pH5.0) 60mlに溶解し、同緩衝液で平衡化したMarathon WBA (樹脂2ml、ダウケミカル社製) に供して素通り画分を得た。これに20%飽和となるように硫酸を添加し、20%飽和硫酸/20mM酢酸緩衝液 (pH5.0) で平衡化したキトパールBCW3510 (樹脂2ml、富士紡績 (株) 製) に固定

化して固定化酵素を調製した。この固定化酵素樹脂を、アスコルビン酸 0.35 g とセロビオース 1 g を溶解した 20% 飽和硫酸 / 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 10 ml に添加して 37℃ で反応させた。結果を表 4 に示した。

【0072】

【表 4】

反応時間	AA (%)	AA6βG (%)	AA2βG (%)
1 日目	94.1	4.8	1.1
2 日目	91.2	7.6	1.2

【0073】

実施例 7 (β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸の精製

セルラーゼ剤 (Sigma) 20 mg を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 ml に溶解し、同緩衝液で平衡化した Marathon WBA (樹脂 0.5 ml、ダウケミカル社製) に供して素通り画分を得た。この酵素液を、アスコルビン酸 0.35 g とセロビオース 1 g を溶解した 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 10 ml に添加して 37℃ で 2 日間反応させた結果、6-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸 11.8%、2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸 0.8% の反応液を得た。本溶液を UF 膜で濾過して酵素を回収除去した液 (pH 4.3、電導度 1.6 mS/cm) を Dowex 1-X8 カラム (酢酸型、1.5 X 12 cm) に SV = 2.5 にて通導した。通導後、約 10 カラム体積 (200 mL) の蒸留水による洗浄、0-0.1 M 酢酸の直線濃度勾配溶出 (80 mL X 2)、そして 0.1-1.0 M 酢酸の直線濃度勾配溶出 (80 mL X 2) を行った。6-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸高含有画分 (フラクション 65-68)、未反応アスコルビン酸高含有画分、2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸高含有画分 (フラクション 101-108) の順に分画された。このフラクション 101-108 画分を 2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸高含有画分として採取した (2.4 mg、回収率 45%)。

【0074】

実施例 8 紫外線 B 波 (UVB) 照射によるヒト皮膚表皮由来の角化細胞 (H

a C a T) の細胞死に対する2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の保護効果:

ヒト皮膚角化細胞H a C a T (ハイデルベルグ大学Fusenig博士から恵与された細胞株)を10%ウシ胎仔血清 (F B S) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) 中で24ウェルプレートに10000細胞/ウェルを蒔いて18時間後に35ミリジュール/平方センチメートル (mJ/cm^2) のU V B (極大波長312 nm) を照射する。照射前2時間に2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を20-100 μM 添加しておき、照射直前に除去しリンスする。照射は薬剤非存在下P B S中で行ない、照射後はF B S 10%含有D M E M培地で培養を継続し、照射後24時間に細胞生存率を2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスホフェニル)-2 H-テトラゾリウム、一ナトリウム塩 (W S T-1) を用いたミトコンドリア脱水素酵素活性測定法で調べた。結果を図5に示す。同様に、比較例として、2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、アスコルビン酸も検討し、同じく図5に示した。

【0075】

実施例9 ヒト皮膚角化細胞での細胞内アスコルビン酸の濃度に対する2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の効果:

ヒト皮膚角化細胞H a C a T細胞を100ミリメートル 直径のディッシュに370000細胞蒔く。培養16時間後に、H a C a Tの24時間無血清培養液を40%添加した10%FBS含有D M E M培地に溶かした2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を100 μM 加える。添加後3-24時間に培地を除去して、氷冷したP B Sで2回リンスし、トリプシンで細胞シートを剥離し、単一細胞の状態とする。これを50 μM のジチオスレイトール (D T T) を含有したP B Sで懸濁し、遠心処理によって3回リンスする。細胞懸濁液をポッター型テフロンホモジェナイザで破碎し、次いで液体窒素中で2回凍結・融解させる。この上澄み液をモルカット (日本ミリポア (株) 製、加圧式限外ろ過ユニット、分画分子量 10000、ポリエーテルスルホン膜) 処理して高速液体クロマトグラフィー (東ソー (株) 製 A S-8020システム、カラム: S h o d e x O D S p a k (昭和電工 (株) 製、4.6 X 150 mm)、移動相: 0.1

M KH_2PO_4 - H_3PO_4 (pH 2.35) - 0.1 mM EDTA - 2 Na、流速: 1.5 mL/分) で細胞内アスコルビン酸量をクーロメトリック電気化学検出器 (ESA Co, Bedford, MA, 200 mV) で分析する。結果を図6に示す。同様に、比較例として、2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、アスコルビン酸も検討し、同じく図6に示した。

【0076】

実施例10 ヒト皮膚真皮由来の線維芽細胞 (NHDF) のコラーゲン合成に関する2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の促進効果:

ヒト皮膚繊維芽細胞NHDFを100ミリメートル 直径のディッシュに370000細胞蒔く。16時間後に、NHDFの24時間無血清培養液を40%添加した10%FBS含有DMEM培地中に、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を100 μ M加える。さらに1時間後にL-[2,3- ^3H]プロリンを0.12 mL (120 μ Ci) 添加して、48時間培養する。培養後に培地を除去し、細胞シートをPBSで4回リンスする。次いで細胞をトリプシン剥離し、アルカリで細胞溶解した後、中和して細胞内蛋白質を得る。これをClostridiumのコラーゲナーゼでコラーゲン分解して得られた蛋白質画分を、シンチゾールEX-Hを用いた液体シンチレーションカウンタで放射活性として測定する。また、コラーゲナーゼで処理しない細胞内蛋白質画分を、同じく液体シンチレーションカウンタで放射活性として測定する。それぞれの放射活性の差を求めて、コラーゲン合成活性とする。結果を図7に示す。同様に、比較例として、2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、アスコルビン酸も検討し、同じく図7に示した。

【0077】

実施例11 ラット経口吸収実験

一終夜絶食した日本チャールスリバー社製Wistar系 10週齢 雄性ラット (n=3) に、100 mg/kgの用量で、Milli-Q超純水 (ミリポアコーポレーション製) に溶かした2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸 (100 mg/4 mL) をゾンデにて覚醒下、強制経口投与し、0、0.5、2、4時間後に門脈よりヘパリン採血し、遠心分離 (6000 x g、10分) にて血漿を分離した。氷冷した10%メタリン酸 (40 mM デフェロキサミンメシ

レート含有)を等量添加後、遠心分離する(10000 x g、10分)ことによって除タンパク処理した門脈血血漿に含まれる未変化体(2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸)およびアスコルビン酸を高速液体クロマトグラフィー(島津製作所(株)製 LC-10Ai システム、カラム: Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス(株)製、3.0 X 150 mm、5 μ m)、移動相: 15% MeOH-17 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (pH 3.5)-5 mM 臭化テトラ- n -アミルアンモニウム、流速: 0.3 mL/分、カラム温度: 35 $^{\circ}$ C、検出波長: 254 nm)にて測定した。投与30分後を最大とする未変化体(2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸)および代謝物(アスコルビン酸)の存在が認められた。その結果を図8に示した。

【0078】

以上の結果から、本発明の2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は、2-0-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸よりその安定性・活性持続の点で生理作用が優れたプロビタミンCであることが示された。このことから食品、化粧品、医薬部外品あるいは医薬品の分野で応用が期待される。また2-0-(テトラ-0-アセチル- β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を製造する上で有用な新規中間体となる。また、クコシあるいはクコシ類縁植物から抽出することにより2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物を得ることができる。また、化学合成以外にも糖転移酵素反応により2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 クコシから抽出した2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸のイオン交換クロマトグラフィーの結果である。

【図2】 図1の画分19-25の一部を用いて、2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸をさらに高速液体クロマトグラフィーで精製して、 ^1H -NMRで化学合成品と比較した結果を示す。上のチャートがクコシ由来2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、下のチャートが化学合成による2-0-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸のスペクトルを示す。

【図 3】 酵素合成した 2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸 (物質 Y) を $^1\text{H-NMR}$ で化学合成品と比較した結果を示す。上のチャートが化学合成による 2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸、下のチャートが酵素反応生成物 (物質 Y) の 2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸のスペクトルを示す。

【図 4】 酵素合成した 6-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸 (物質 X) を二次元 $^1\text{H-NMR}$ で化学合成による 2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸と比較した H S Q C スペクトルを示す。上のチャートが酵素反応生成物の 6-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸 (物質 X) のスペクトル、下のチャートが化学合成した 2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸のスペクトルを示す。

【図 5】 紫外線 B 波 (U V B) 照射によるヒト皮膚表皮由来の角化細胞 (H a C a T) の細胞死に対する 2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の保護効果を示す。

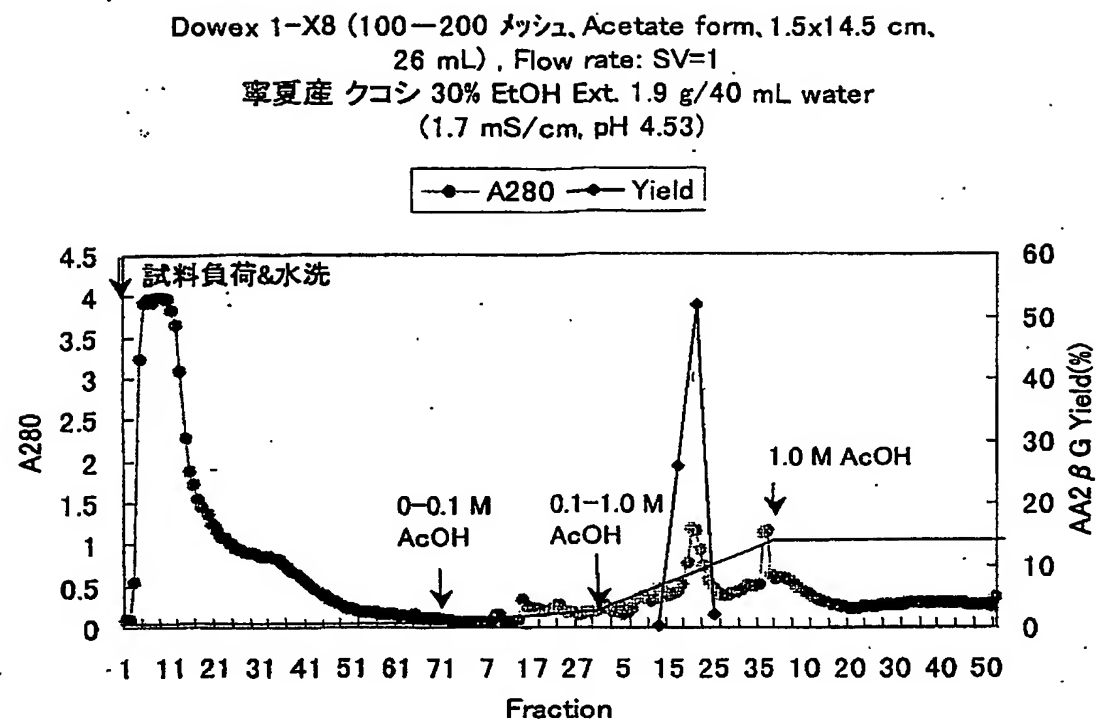
【図 6】 ヒト皮膚角化細胞での細胞内アスコルビン酸の濃度に対する 2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の効果を示す。

【図 7】 ヒト皮膚真皮由来の線維芽細胞 (N H D F) のコラーゲン合成に関する 2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の促進効果を示す。

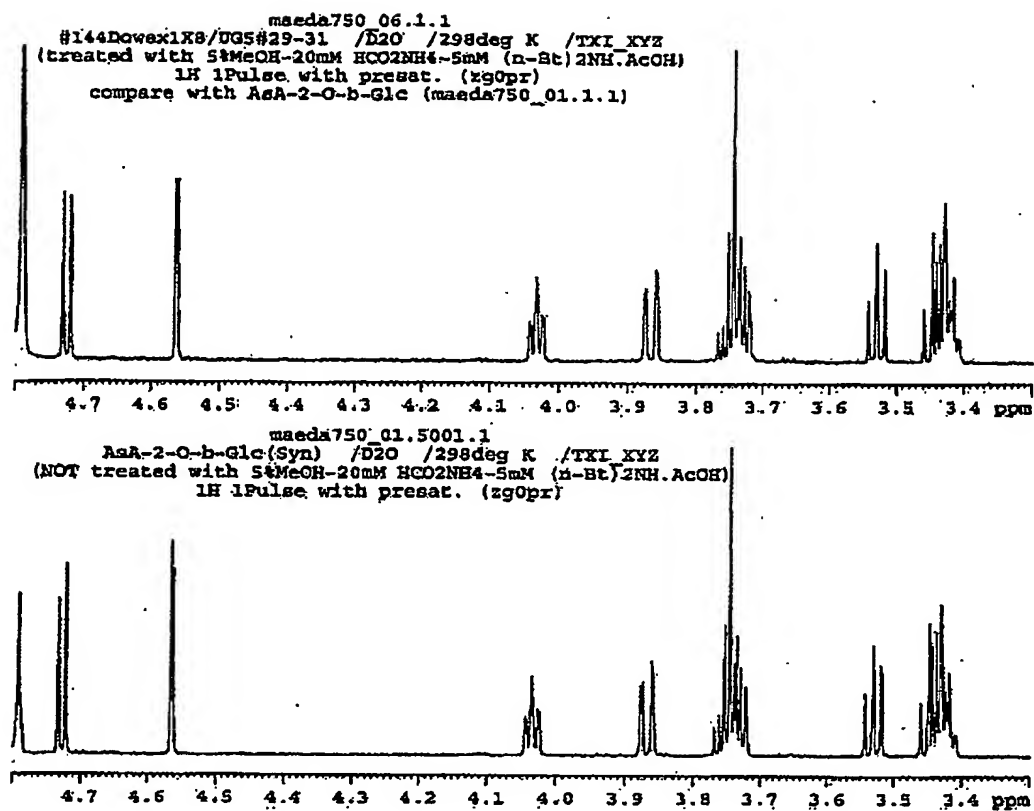
【図 8】 2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸 1 0 0 mg/kg 経口投与後のラット門脈血および血漿中の濃度推移を示す。

【書類名】 図面

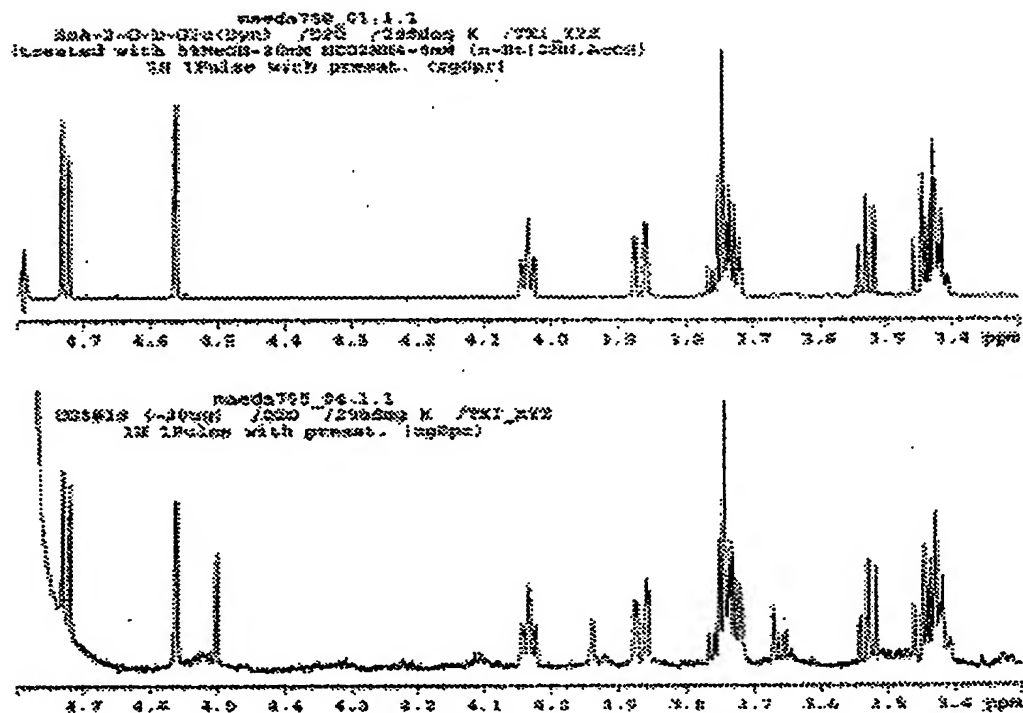
【図 1】



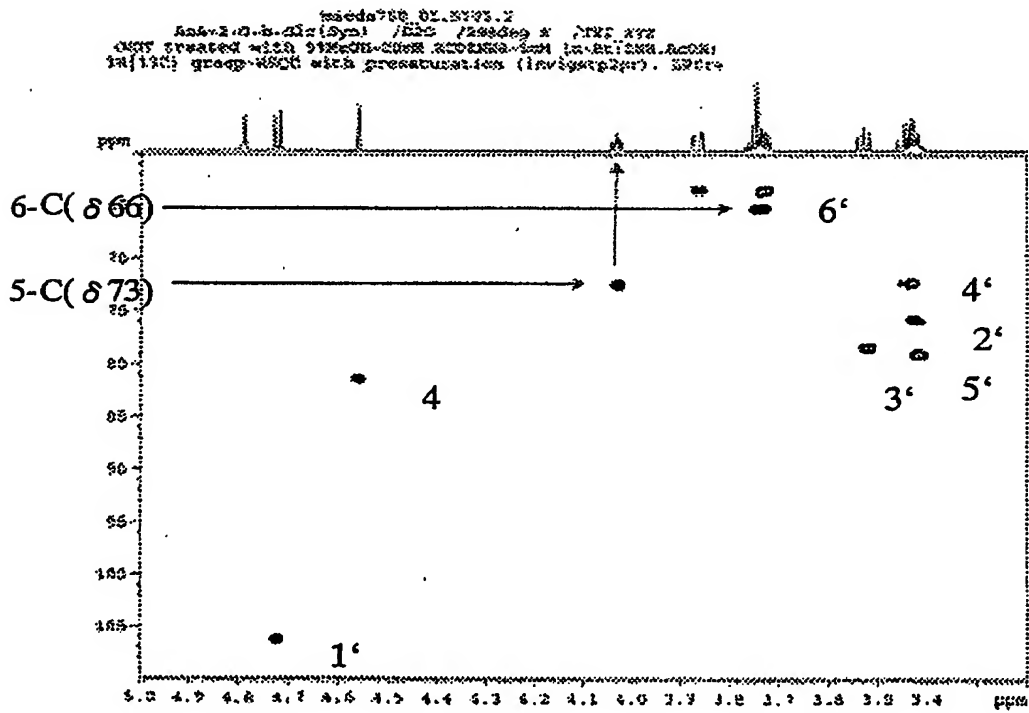
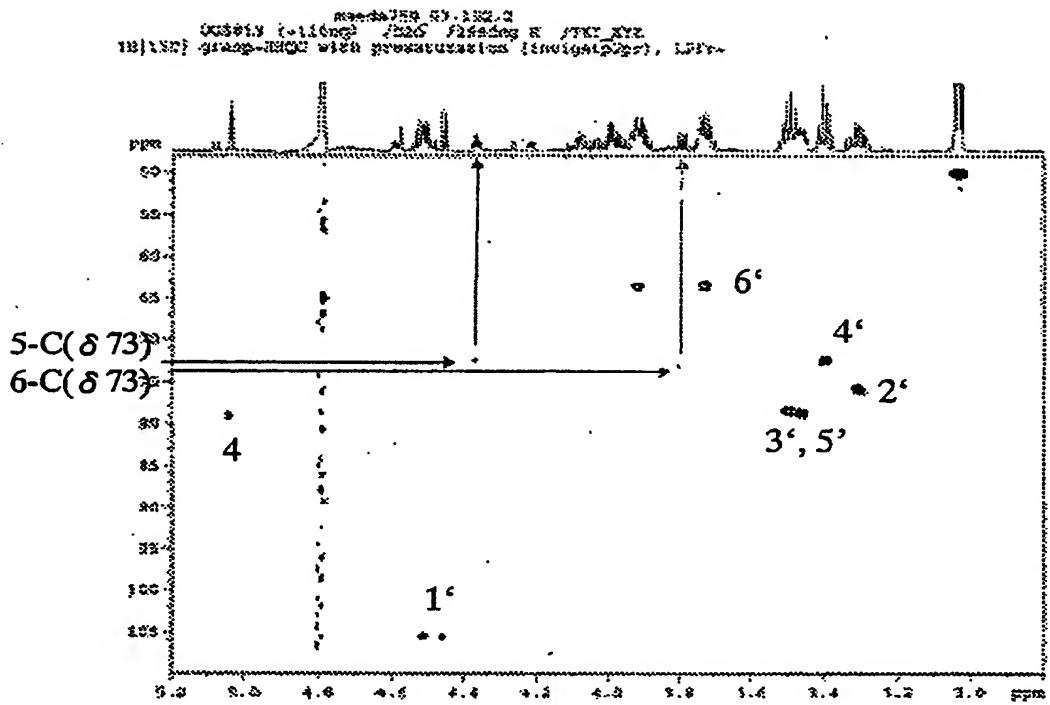
【図 2】



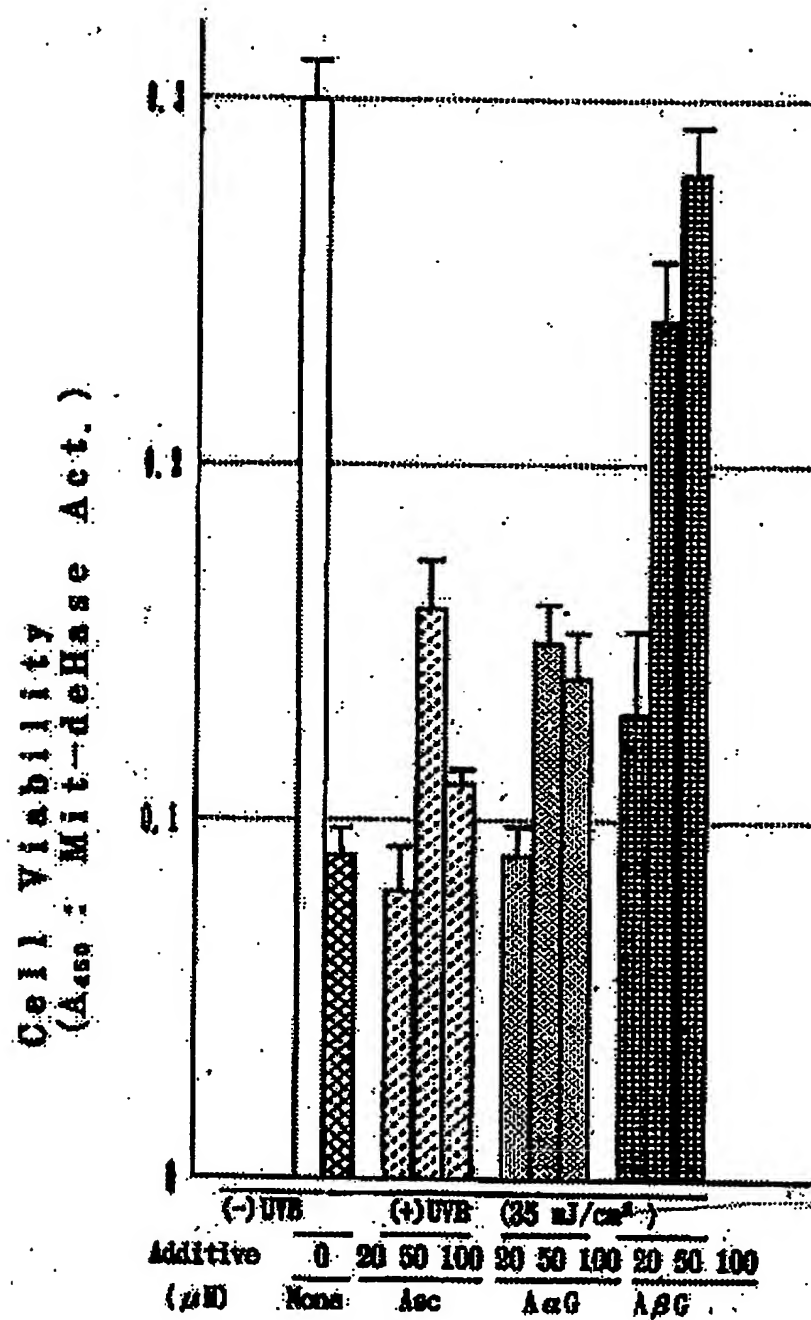
【図 3】



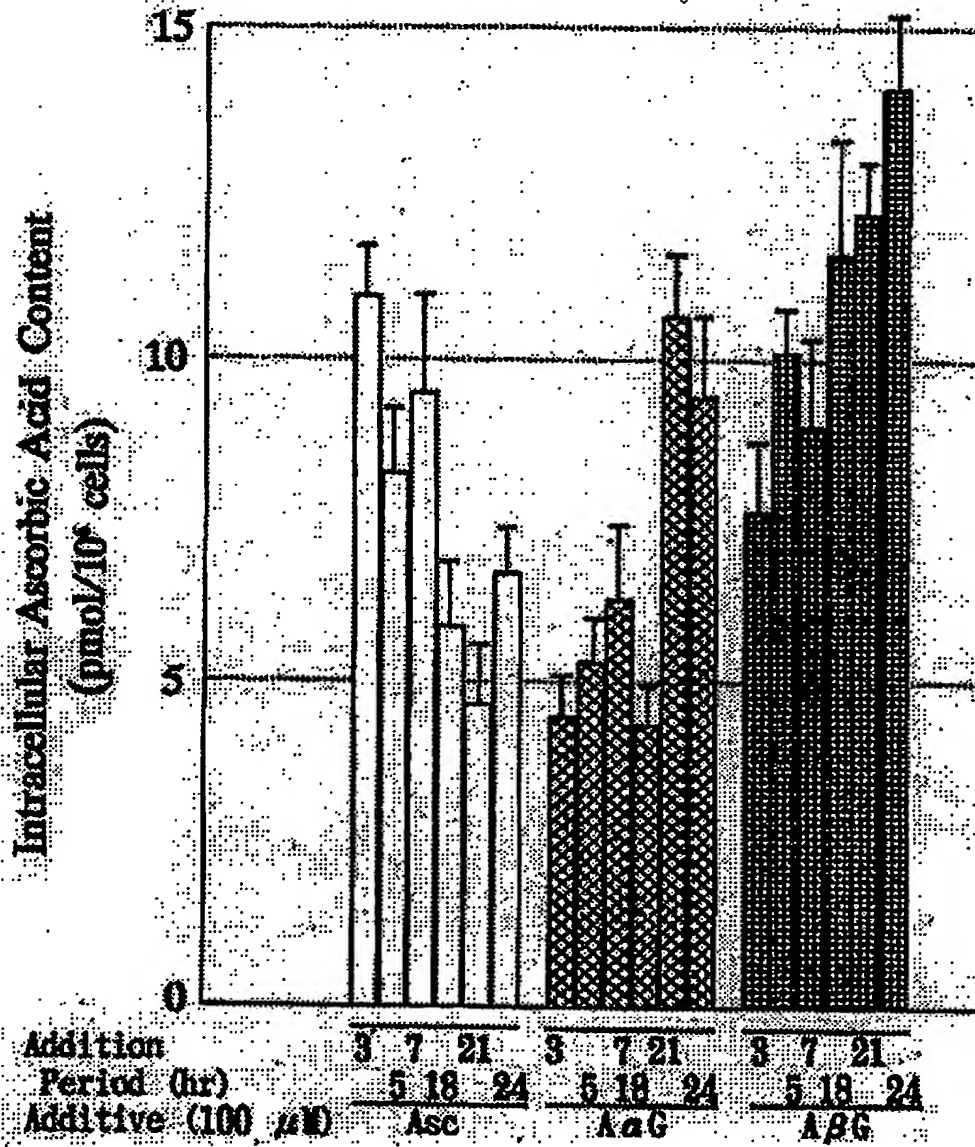
【図 4】



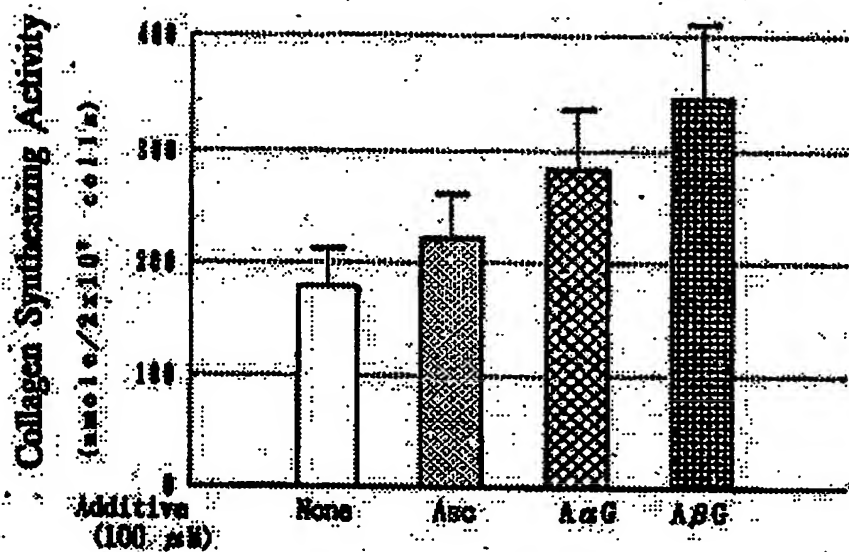
【図5】



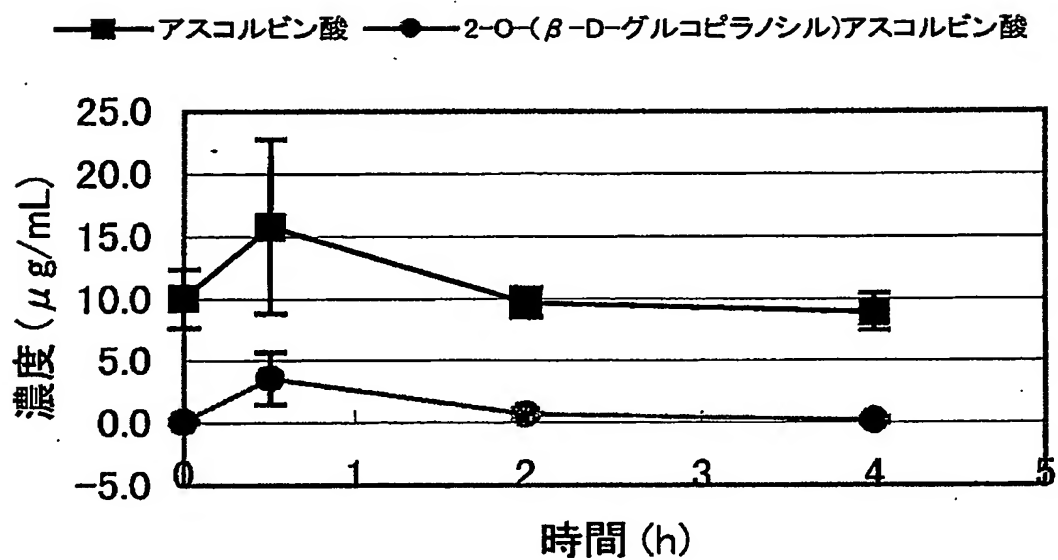
【図6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プロビタミンCとして、従来知られている2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸よりも、生体内で安定性が向上し、生体内で持続的に利用される新規アスコルビン酸誘導体を提供する。

【解決手段】 クコ等の植物から、新規化合物、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物を抽出した。2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有する組成物は、 β -D-グルコシル糖転移酵素を用いて酵素合成することもできる。これらの組成物から純粋な2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を製造することができる。あるいは2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を化学合成法で製造することも可能である。2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は、対応する α -D-グルコピラノシル誘導体に比べて、生体内に摂取されたとき、生じるビタミンCの安定性および持続性が高いので、化粧品や食品に用いるプロビタミンCとして非常に適する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

氏 名 サントリー株式会社